第30卷 第3期　　昆虫学报　　Vol. 30, No. 3
1987年8月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1987

# 棉铃虫和烟青虫的酯酶同工酶比较

阎一林　郭尧君*　钦俊德
（中国科学院动物研究所）

近年来，同工酶的电泳技术在昆虫种群分化的研究上已成为一种有用的工具。用这种方法所得到的生物化学和遗传学的信息已广泛被应用到探讨昆虫种间的亲缘关系（Ayala, 1970; Saul 等, 1977）、种或亚种的差异（Trebatoski 和 Haynes, 1969; Harrison 和 Vawter 1977; Mahon 等,1976）、种群结构、种下分化(Ayala, 1975; Bartlett, 1981）以及昆虫与寄主植物的关系（Stock 和 Amman, 1980; Jacobson 和 Hsiao, 1983）等方面。

同工酶的概念首先是由 Markert 和 Møller（1959）提出的,他们认为一个种群的基因结构可以根据酶或同工酶的多态性来决定。现知同工酶包括等位基因和异位基因的产物，因此可以用它作为遗传标志来反映自然种群的基因结构的变化和种内、种间的亲缘关系(Avise, 1974; Nevo, 1978)。

用电泳方法对鳞翅目夜蛾科昆虫的同工酶的研究国外已有一些报道。Sell 等（1974,1975）用聚丙烯酰胺凝胶电泳对美洲棉铃虫 *Heliothis zea* 不同种群的老龄幼虫血淋巴进行分析,证实酯酶同工酶的多态性,见到酯酶 II（羧酸酯酶）对于研究美洲棉铃虫的时空变异十分有用。Sluss 和 Graham（1979)观察了烟芽夜蛾 *H. virescens* 不同种群十种同工酶的变异,发现不同种群夜蛾的等位基因频率不同,认为这种差异与寄主植物的不同有关。但对在我国为害棉花和烟草等并且亲缘十分相近的棉铃虫 *H. armigera* 和烟草虫 *H. assulta* 的同工酶问题尚未见报道。

本工作是用薄层聚丙烯胺凝胶等电聚焦电泳分析棉铃虫和烟青虫的酯酶同工酶的差异，并对棉铃虫不同地区种群的酯酶同工酶进行比较,试图为这两种昆虫的鉴定以及棉铃虫种下分化提供资料。

## 材料和方法

### 一、材料

1.来源：棉铃虫：a. 河南省安阳县，b. 河北省饶县，c. 中国科学院动物研究所昆虫生态室实验室品系,原采自山东。d. 湖北荆州地区微生物研究所实验室品系。烟青虫：湖北荆州地区微生物研究所实验室品系。

2.昆虫饲养：以上来源的棉铃虫和烟青虫在25℃、光照周期(14:10)、相对湿度55%条件下饲养，幼虫饲料的配方见吴坤君(1978)的方法。

### 二、方法

取新脱皮的六龄幼虫50头,去头部及消化道,加10毫升蒸馏水,匀浆,以10,000g离心15分钟，弃沉淀,用上清液为样品。

样品进行薄层(0.5毫米)聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳。使用 LKB 多用电泳仪、2197 恒功率电源

本文于1985年5月收到。

* 中国科学院生物物理研究所。

江朝洪、贾泳同志参加部分工作,陈志辉、谢宝俞同志帮助采集棉铃虫,中国科学院动物研究所昆虫生态室及湖北荆州地区微生物研究所提供部分棉铃虫及烟青虫,于延芬同志帮助摄制照片,特此一并表示感谢。

和 2209 多点恒温水浴。薄层凝胶的制做、电泳和保存方法见郭尧君（1983）方法。电泳条件见表1。

表1 电泳条件

| | |
|---|---|
| pH 范围: | 4.0—6.0 |
| 电极溶液: 阳极 | 0.5M 醋酸 |
| 阴极 | 0.5M 氢氧化钠 |
| 电泳温度 | 10℃ |
| 上限电压 | 1500V |
| 上限电流 | 25mA |
| 上限功率 | 25W |
| 时间 | 2 小时 |

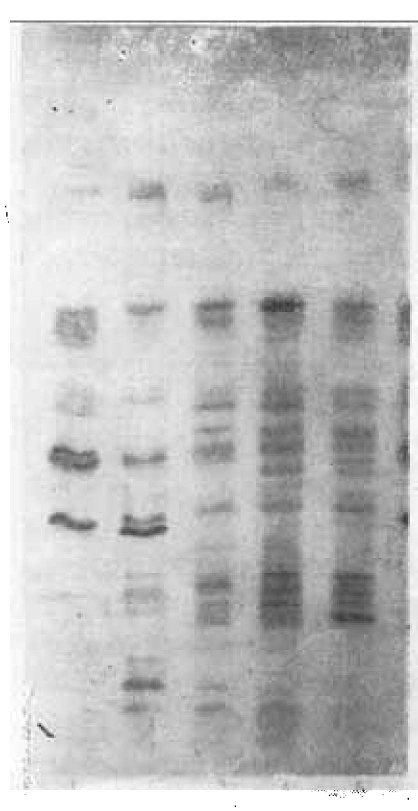


图 1 烟青虫和棉铃虫六龄幼虫酯酶同工酶电泳图谱
1.烟青虫 2.棉铃虫（湖北）3.棉铃虫（河南）4.棉铃虫（河北）5.棉铃虫（北京）

电泳结束后，用表面电极测凝胶的 pH，然后进行酯酶染色。

酯酶染色方法：坚牢固兰 RR 盐 250 毫克，溶于 250 毫升 0.1M 磷酸缓冲液中（pH5.5），加入 1%α-乙酸萘酯(溶于 70% 乙醇中)3.75 毫升，2%β-乙酸萘酯(溶于 70% 乙醇中) 6 毫升。将凝胶置于上述混合溶液中，20℃保温 30 分钟。

酯酶的抑制实验：电泳毕的凝胶放在含有不同抑制剂的酯酶染色液中进行抑制实验，以不加抑制剂者为对照。抑制剂及其浓度为：敌敌畏 $10^{-5}$M，乙二胺四乙酸 $10^{-2}$M，毒扁豆碱 $10^{-4}$M。

## 结 果

用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳方法分析棉铃虫和烟青虫的酯酶同工酶，可以观察到两种昆虫具有较高的酯酶活性，主要的酯酶带集中在 pH4.0—6.0 范围内。棉铃虫，烟青虫以及不同地区的棉铃虫六龄幼虫的酯酶同工酶等电点见表 2。

从不同地区的棉铃虫的酯酶图谱(图 1)可以看出河南、河北、北京三个地区的棉铃虫差异较小，而湖北的品系与前三者比较则差异较大。

酯酶的抑制实验结果(图 2)表明：这些酯酶活性可以完全被敌敌畏所抑制，但对毒扁豆碱和乙二胺四乙酸的作用都不敏感。Stock 和 Robertson（1982）曾证明这些酯酶主要是羧酸酯酶（E. C. 3.1.1.1.）。敌敌畏是有效的羧酸酯酶抑制剂，在 $10^{-5}$M 可以完全抑制羧酸酯酶活性。

## 讨 论

本实验结果表明，用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术来进行酯酶同工酶的分析是一种灵敏、有效

的方法。用常规电泳方法所不能区分的分子量接近的一些蛋白质(同工酶)，可根据其等电点的不同，在一个稳定、连续、线性的 pH 梯度中得到分离。但能水解乙酸萘酯的酯酶是否都能归入同功酶的范畴，尚需进一步探明，而抑制剂的使用结果，说明它们是羧酸酯酸，应用此方法可以确定鳞翅目夜蛾科的两个

表 2　烟青虫和棉铃虫六龄幼虫酯酶同工酶等电点

| | 棉铃虫 | | | | 烟青虫 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 河南 | 河北 | 北京 | 湖北 | |
| | | | | | 4.05 |
| | | | | | 4.08 |
| | 4.10 | 4.10 | 4.10 | 4.10 | 4.10 |
| | 4.45 | | | 4.45 | 4.45 |
| | | | | 4.07 | |
| | 4.57 | 4.57 | 4.57 | | |
| | 4.59 | 4.59 | 4.59 | 4.59 | 4.59 |
| | | | | | 4.62 |
| | 4.65 | 4.65 | 4.65 | 4.65 | |
| | | | | | 4.67 |
| | 4.68 | 4.68 | 4.68 | 4.68 | |
| | 4.69 | 4.69 | 4.69 | 4.69 | |
| | 4.70 | 4.70 | 4.70 | 4.70 | 4.70 |
| | 4.75 | | 4.75 | | |
| | 4.78 | 4.78 | 4.78 | | |
| | | | | 4.80 | |
| | 4.84 | 4.84 | 4.84 | 4.84 | 4.84 |
| | | | 4.85 | | 4.85 |
| | 4.86 | 4.86 | 4.86 | 4.86 | 4.86 |
| | | | 4.91 | | |
| | 4.93 | 4.93 | 4.93 | 4.93 | |
| | 4.94 | 4.94 | | | 4.94 |
| | | 4.96 | 4.96 | 4.96 | 4.96 |
| | 4.98 | 4.98 | 4.98 | 4.98 | |
| | | 5.00 | | | |
| | 5.02 | | | | |
| | 5.04 | 5.04 | 5.04 | | 5.04 |
| | | 5.06 | | 5.06 | |
| | 5.08 | 5.08 | | | |
| | | | | 5.09 | |
| | | | 5.11 | | |
| | | | 5.14 | 5.14 | |
| | 5.16 | | 5.16 | | 5.16 |
| | | | 5.27 | 5.27 | |
| | 5.29 | | 5.29 | 5.29 | |
| | | 5.31 | | | |
| | 5.33 | 5.33 | 5.33 | 5.33 | 5.33 |
| | 5.35 | 5.35 | | | |
| | | 5.37 | | | |
| | | | 5.39 | | |
| | | | | [illegible].40 | |
| | | 5.41 | | | |
| | 5.52 | | 5.52 | 5.52 | |
| | 5.75 | | | 5.75 | |
| | 5.77 | | | 5.77 | |
| | | | | 5.79 | |
| | | | | | 5.80 |
| | | 5.83 | 5.83 | 5.83 | 5.83 |
| | 5.90 | 5.90 | 5.90 | | |
| 酯酶带数 | 26 | 25 | 27 | 26 | 18 |

近缘种棉铃虫和烟青虫的差异。对来源于河南安阳县，河北饶县，北京(实验室品系)，湖北(实验室品系)的棉铃虫中六龄幼虫的酯酶图谱进行比较，可以观察到不同地区种群的酯酶图谱有所不同。此结果对棉铃虫的种群基因结构以及种下分化提供了一定的证据。

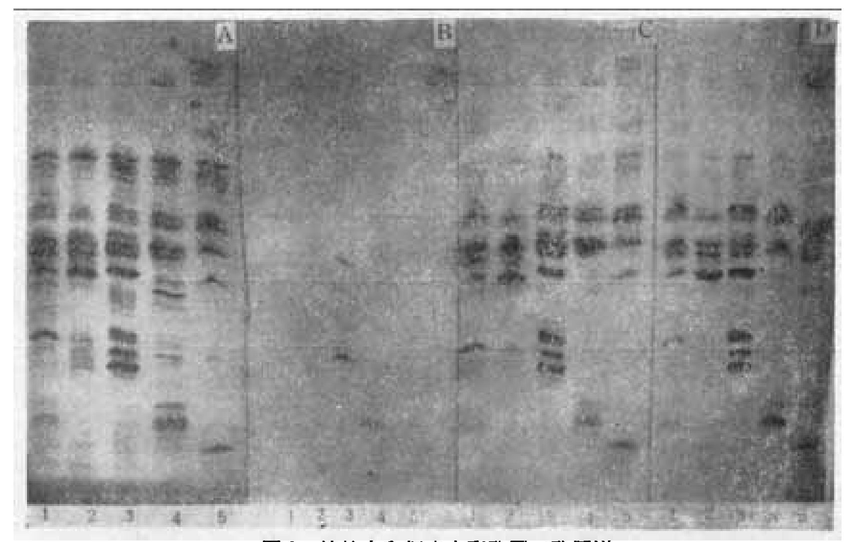



图2 棉铃虫和烟青虫酯酶同工酶图谱
A. 酯酶同工酶(无抑制剂)， B. 敌敌畏($10^{-5}$M) 抑制实验， C. 乙二胺四乙酸($10^{-2}$M)抑制实验， D. 毒扁豆碱($10^{-4}$M)和乙二胺四乙酸($10^{-2}$M)抑制实验。
1.棉铃虫(河南)， 2.棉铃虫(河北)， 3.棉铃虫(北京)， 4.棉铃虫(湖北)， 5.烟青虫

## 参 考 文 献

吴坤君 1985 棉铃虫的紫云英一麦胚人工饲料。昆虫学报 **28**(1): 22—9。

郭尧君 1983 薄层 (0.5 mm) 凝胶等电聚焦技术。生物化学与生物物理进展 **3**: 50—7。

Avise, J. C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* **23**: 465—81.

Ayala, F. J. 1970. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group I. Genetic differences among sibling species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**: 225—32.

Ayala, F. J. 1975 Genetic differentiation during the speciation process. *Evol. Biol.* **8**: 1—75.

Bartlett, A. C. 1981. Isozyme polymorphism in populations of the pink bollworm. Ann. Entomol. *Soc. Am.* **74**: 9—13.

Harrison, R. G. and A. T. Vawter 1977. Allozyme differentiations between pheromone strains of the European corn border, *Ostrinia nubilalis*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **70**: 717—20.

Jacobson, J. W. and T. H. Hsiao 1983. Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) *Ann. Entomol. Soc. Am.* **76**: 162—6.

Mahon, R. T. et al. 1976. Diagnostic alloenzymes for routine identification of the *Anopheles gambiae* complex. *Bull. Ent. Res.* **66**: 25—31.

Markert, C. L. and F. Møller. 1959 Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **45**: 753—63.

Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor. Pop. Biol.* **13**: 121—77.

Sell, D. K. et al. 1974. Enzyme polymorphism in the corn earworm, *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Hemolymph esterase polymorphism. *Can. Entomol.* **106**: 701—9.

Sell, D. K. et al. 1975 Esterase polymorphism in the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie): A survey of temporal and spatial alleic variation in natural populations. *Biochem. Genet.* **13**: 885—98.

Sluss, T. P. and H. M. Graham 1979. Allozyme variation in natural populations of *Heliothis virescens*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **72**: 317—22.

Stock, M. W. and G. D. Amman 1980 Genetic differentiation among mountain pine beetle populations from lodgepole pine and ponderosa pine in northeast Utah. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **73**: 472—8.

Trebatoski, A. M. and Haynes, J. F. 1969 Comparison of enzymes of twelve species of mosquitoes. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **62**: 327—35.

# COMPARISON OF ESTERASE ISOZYMES OF *HELIOTHIS ARMIGERA* AND *H. ASSULTA*

YAN YI-LIN, *GUO YAO-JUN, QIN GUN-DE

*(Institute of Zoology, *Institute of Biophysics, Academia Sinica)*